

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類7 C12N 15/12, A01K 67/027, A61K 31/7088, 48/00, G01N 33/50	A1	(11) 国際公開番号 WO00/42180 (43) 国際公開日 2000年7月20日(20.07.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP00/00106 (22) 国際出願日 2000年1月12日(12.01.00) (30) 優先権データ 特願平11/7226 1999年1月14日(14.01.99) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 協和醗酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)[JP/JP] 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 山田陽史(YAMADA, Yoji)[JP/JP] 中川 智(NAKAGAWA, Satoshi)[JP/JP] 関根 進(SEKINE, Susumu)[JP/JP] 〒194-8533 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) 添付公開書類 国際調査報告書 明細書とは別に規則13の2に基づいて提出された生物材料の寄託に関する表示。
(54) Title: NOVEL PROTEIN (54) 発明の名称 新規蛋白質 (57) Abstract A protein having the amino acid sequence represented by SEQ ID N° 1 which has an ability to bind to a ligand and an ability to bind to a DNA and is useful in searching and developing remedies for inflammation, cancer, osteoporosis, diabetes, kidney diseases, etc.; a DNA encoding this protein; a recombinant vector containing this DNA; a transformant obtained by transferring this recombinant vector into host cells; an oligonucleotide corresponding to a part of the sequence of the above DNA; an antibody recognizing the above protein; and utilization thereof.		

①のA

(19)日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11)国際公開番号

WO 00 / 4 2 1 8 0

発行日 平成14年5月14日(2002.5.14)

(43)国際公開日 平成12年7月20日(2000.7.20)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	FI	
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 0 1 K 67/027		A 0 1 K 67/027	
A 6 1 K 31/7088		A 6 1 K 31/7088	
48/00		48/00	
A 6 1 P 3/10		A 6 1 P 3/10	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 59 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2000-593737(P2000-593737)	(71)出願人	協和醗酵工業株式会社
(21)国際出願番号	PCT/JP00/00106		東京都千代田区大手町1丁目6番1号
(22)国際出願日	平成12年1月12日(2000.1.12)	(72)発明者	山田 陽史
(31)優先権主張番号	特願平11-7226		東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内
(32)優先日	平成11年1月14日(1999.1.14)	(72)発明者	中川 智
(33)優先権主張国	日本(JP)		東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内
		(72)発明者	関根 進
			東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規蛋白質

(57)【要約】

本発明は、炎症、癌、骨粗鬆症、糖尿病、腎疾患等の治療薬の探索、開発に有用なリガンド結合能およびDNA結合能を有する配列番号1のアミノ酸配列を有する蛋白質、該蛋白質をコードするDNA、該DNAを含有してなる組換えベクター、該組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換体、該DNAの一部配列に相当するオリゴヌクレオチド、該蛋白質を認識する抗体、およびこれらの利用方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列からなる蛋白質。

【請求項 2】 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号 1 で示されるアミノ酸配列からなる蛋白質の有するリガンド結合能および DNA 結合能を有する蛋白質。

【請求項 3】 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列と 95% 以上の相溶性を有するアミノ酸配列を含み、かつ配列番号 1 で示されるアミノ酸配列からなる蛋白質の有するリガンド結合能および DNA 結合能を有する蛋白質。

【請求項 4】 請求項 1～3 のいずれかに記載の蛋白質をコードする DNA。

【請求項 5】 配列番号 2 の 140～1438 番目の塩基配列を有する DNA。

【請求項 6】 請求項 4 または 5 に記載の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、配列番号 2 の 140～1438 番目の塩基配列と 90% 以上の相溶性を有し、かつ配列番号 1 で示されるアミノ酸配列からなる蛋白質の有するリガンド結合能および DNA 結合能を有する蛋白質をコードする DNA。

【請求項 7】 塩基配列番号 140～1438 の塩基配列と DH5 α /pERR4 (FERM BP-6513) の保存するプラスミドに含まれ、かつリガンド結合能および DNA 結合能を有する蛋白質をコードする DNA。

【請求項 8】 請求項 4～7 のいずれかに記載の DNA を含有してなる融解エベクター。

【請求項 9】 請求項 8 に記載の融解エベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

【請求項 10】 請求項 9 に記載の形質転換体を細胞に培養し、培養物中に請求項 1～3 のいずれかに記載の蛋白質を生成誘導させ、該培養物から該蛋白質を採取することを特徴とする蛋白質の製造方法。

【請求項 11】 請求項 1～3 のいずれかに記載の蛋白質を認識する抗体。

【請求項 12】 請求項 4～7 のいずれかに記載の DNA の有する塩基配列中の連続した 5～60 塩基からなる配列に相当するオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチドと相補的な配列に相当するオリゴヌクレオチド。

【請求項 23】 請求項 12 に記載のオリゴヌクレオチドを用いることを特徴とする、請求項 1～3 のいずれかに記載の蛋白質をコードする遺伝子のプロモーター領域を特定する方法。

【請求項 24】 請求項 4～7 のいずれかに記載の DNA を含有する、炎症、癌、骨粗鬆症、糖尿病または腎疾患の診断薬。

【請求項 25】 請求項 12 に記載のオリゴヌクレオチドを含有する、炎症、癌、骨粗鬆症、糖尿病または腎疾患の診断薬。

【請求項 26】 請求項 4～7 のいずれかに記載の DNA を含有する医薬。

【請求項 27】 請求項 12 に記載のオリゴヌクレオチドを含有する医薬。

【請求項 28】 請求項 4～7 のいずれかに記載の DNA を含有する炎症、癌、骨粗鬆症、糖尿病または腎疾患の治療薬。

【請求項 29】 請求項 12 に記載のオリゴヌクレオチドを含有する炎症、癌、骨粗鬆症、糖尿病または腎疾患の治療薬。

【請求項 30】 請求項 1～3 のいずれかに記載の蛋白質を用いることを特徴とする、該蛋白質と特異的に結合するリガンドのスクリーニング方法。

【請求項 31】 請求項 30 の方法により取得されるリガンド。

【請求項 32】 請求項 11 に記載の抗体を用いることを特徴とする、請求項 1～3 のいずれかに記載の蛋白質の免疫学的検出法。

【請求項 33】 請求項 11 に記載の抗体を用い、請求項 1～3 のいずれかに記載の蛋白質を検出することを特徴とする免疫組織染色法。

【請求項 34】 請求項 11 に記載の抗体を含有する炎症、癌、骨粗鬆症、糖尿病または腎疾患の診断薬。

【請求項 35】 請求項 11 に記載の抗体を含有する医薬。

【請求項 36】 請求項 11 に記載の抗体を含有する炎症、癌、骨粗鬆症、糖尿病または腎疾患の治療薬。

【請求項 37】 請求項 9 に記載の形質転換体を用いることを特徴とする、請求項 1～3 のいずれかに記載の蛋白質をコードする遺伝子の転写を調節する物質のスクリーニング方法。

【請求項 38】 請求項 9 に記載の形質転換体を用いることを特徴とする、請求項

【請求項 13】 請求項 4～7 のいずれかに記載の DNA を用い、ハイブリダイゼーション法により、請求項 1～3 のいずれかに記載の蛋白質をコードする遺伝子の発現を検出する方法。

【請求項 14】 請求項 12 に記載のオリゴヌクレオチドを用い、ポリメラーゼ・チェイン・リアクション法により、請求項 1～3 のいずれかに記載の蛋白質をコードする遺伝子の発現を検出する方法。

【請求項 15】 請求項 4～7 のいずれかに記載の DNA を用い、ハイブリダイゼーション法により、請求項 1～3 のいずれかに記載の蛋白質をコードする遺伝子の発現を検出する方法。

【請求項 16】 請求項 12 に記載のオリゴヌクレオチドを用い、ポリメラーゼ・チェイン・リアクション法により、請求項 1～3 のいずれかに記載の蛋白質をコードする遺伝子の発現を検出する方法。

【請求項 17】 請求項 13～16 のいずれかに記載の方法を用いて炎症、癌、骨粗鬆症、糖尿病または腎疾患を検出する方法。

【請求項 18】 請求項 4～7 のいずれかに記載の DNA を用いることを特徴とする、請求項 1～3 のいずれかに記載の蛋白質をコードする遺伝子の転写を調節する方法。

【請求項 19】 請求項 12 に記載のオリゴヌクレオチドを用いることを特徴とする、請求項 1～3 のいずれかに記載の蛋白質をコードする遺伝子の転写を抑制する方法。

【請求項 20】 請求項 4～7 のいずれかに記載の DNA を用いることを特徴とする、請求項 1～3 のいずれかに記載の蛋白質をコードする mRNA の翻訳を抑制する方法。

【請求項 21】 請求項 12 に記載のオリゴヌクレオチドを用いることを特徴とする、請求項 1～3 のいずれかに記載の蛋白質をコードする mRNA の翻訳を抑制する方法。

【請求項 22】 請求項 4～7 のいずれかに記載の DNA を用いることを特徴とする、請求項 1～3 のいずれかに記載の蛋白質をコードする遺伝子のプロモーター領域を特定する方法。

1～3 のいずれかに記載の蛋白質による転写調節機能に関与する物質のスクリーニング方法。

【請求項 39】 請求項 9 に記載の形質転換体を用いることを特徴とする、請求項 1～3 のいずれかに記載の蛋白質により転写調節を受ける遺伝子のスクリーニング方法。

【請求項 40】 請求項 1～3 のいずれかに記載の蛋白質をコードする遺伝子の発現が一部または完全に抑制されたノックアウトヒト動物。

【請求項 41】 請求項 1～3 のいずれかに記載の蛋白質の有する機能が一部または完全に抑制されたノックアウトヒト動物。

(36) (11) 記載の抗体を含有する試薬、剤、含有液、組成物または製剤の製造。

(37) (9) 記載の形質転換体を用いることを特徴とする、(1)～(3)のいずれかに記載の蛋白質をコードする遺伝子の転写を制御する物質のスクリーニング方法。

(38) (9) 記載の形質転換体を用いることを特徴とする、(1)～(3)のいずれかに記載の蛋白質による転写制御機能に關する物質のスクリーニング方法。

(39) (9) 記載の形質転換体を用いることを特徴とする、(1)～(3)のいずれかに記載の蛋白質により転写制御を受ける遺伝子のスクリーニング方法。

(40) (1)～(3)のいずれかに記載の蛋白質をコードする遺伝子の発現が一部または完全に抑制されたノックアウト非ヒト動物。

(41) (1)～(3)のいずれかに記載の蛋白質を有する特性が一部または完全に抑制されたノックアウト非ヒト動物。

本発明の蛋白質は、プロゲステロン、アンドロゲン、ビタミンD、グルココルチコイド、性腺ステロイド等のステロイドホルモン、エストロゲン、甲状腺ホルモン、レチノイン酸、9-cisレチノイン、またはこれらのアゴニスト、アンタゴニスト等のリガンドと結合する能力(以下、リガンド結合能と略す)を有し、かつジンク・フィンガー(zinc finger)構造を持つことによりDNAと結合する能力(以下、DNA結合能と略す)を有する蛋白質である。

本発明の蛋白質として、例えば、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質(以下、該蛋白質をERR1と呼ぶこともある)、該蛋白質をコードするアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ該蛋白質の有するリガンド結合能およびDNA結合能を有する蛋白質、配列番号1で示されるアミノ酸配列と、BLAST(J. Mol. Biol., 215, 403(1990))やFASTA(Methods in Enzymology, 155, 63-98(1990))等を用いて比較したときに、95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつリガンド結合

能およびDNA結合能を有する蛋白質等をあげることができる。

配列番号1で示されるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ該蛋白質の有するリガンド結合能およびDNA結合能を有する蛋白質は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)(以下、モレキュラー・クローニング第2巻と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons(1987-1997)(以下、カレント・プロトコルズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す)、Nucleic Acids Research, 11, 6487(1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 72, 6409(1982)、Gene, 131, 315(1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431(1985)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 488(1985)等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば配列番号1で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNAに部位特異的変異を導入することにより獲得することができる。

欠失、置換もしくは付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異法等の周知の方法により欠失、置換もしくは付加できる程度であり、1個から数十個、好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個である。また、本発明の蛋白質が核内レセプターとしての機能を有するためには、BLASTやFASTA等の解析ソフトを用いて比較したときに、配列番号1記載のアミノ酸配列と少なくとも98%以上の相同性を有していることが好ましい。

本発明のDNAとしては、本発明の蛋白質をコードするDNAをあげることができる。例えば、配列番号2の140～1438番目に示される塩基配列を有するDNA、該DNAとストリングエントな条件下でハイブリダイズし、かつリガンド結合能およびDNA結合能を有する蛋白質をコードするDNAをあげることができる。

ストリングエントな条件下でハイブリダイズ可能なDNAとは、配列番号2の140～1438番目に示される塩基配列を有するDNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはザザン・プロット・ハイブリダイゼーション法を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはブラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0mol/lの塩化ナトリウム溶液中、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2M塩度のSSC溶液(1M塩度のSSC溶液の組成は、1.50mol/l塩化ナトリウム、15mmol/lクエン酸ナトリウムよりなる)を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。

ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング第2巻、カレント・プロトコルズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、DNA Cloning I: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University(1995)等に記載されている方法に準じて行うことができる。

ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、BLASTやFASTA等の解析ソフトを用いて比較したときに、配列番号2の140～1438番目に示される塩基配列と少なくとも90%以上の相同性を有するDNA、好ましくは95%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

以下、本発明を詳細に説明する。

1. 本発明のDNAの調製

ヒトの組織より全RNAあるいはmRNAを調製する。

ヒト組織から全RNAを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジニートリフルオロメチル硫酸法(Methods in Enzymology, 155, 3(1987))、陰性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホルム(AGPC)法(Analytical Biochemistry, 155, 156(1987))、実験医学, 3, 1937(1991)等をあげることができる。

全RNAからpoly(A)⁺RNAとしてmRNAを調製する方法としては

オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法(モレキュラー・クローニング第2巻)、オリゴdTラックスを用いる方法(細胞工学 別冊「新細胞工学実験プロトコル」秀和社48-52頁、Nucleic Acids Res., Symposium Series, 15, 61(1988))等をあげることができる。

ファースト・トラック・mRNA分離キット(Fast Track mRNA Isolation Kit: インビトロゲン(Invitrogen)社製)、クイック・プレップ・mRNA分離キット(Quick Prep mRNA Purification Kit: ファルマシア(Pharmacia)社製)等のキットを用いて組織や細胞から直接mRNAを調製することもできる。

また、市販のmRNAを用いることができる。市販のものとしては、例えば、Clontech社製のヒト網膜mRNAをあげることができる。

調製したmRNA、例えば、ヒト網膜mRNAからcDNAライブラリーを構築する。

cDNAライブラリー構築法としては、モレキュラー・クローニング第2巻、カレント・プロトコルズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、A Laboratory Manual, 2nd Ed.,(1989)、DNA Cloning I: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press(1995)等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばSuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning(Life Technologies社製)、ZAP-cDNA Synthesis Kit(ストラタジーン社製)を用いる方法等があげられる。

cDNAライブラリーを構築するためのクローニングベクターとしては、大腸菌K12株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれも使用できる。

具体的には、ZAP Express(ストラタジーン社製、Stratag

ies, 5, 58 (1992)), pBlueScript II SK (+) (Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)), Lambda ZAP II (ストラタジーン社製), λ gt10, λ gt11 (DNA Cloning: A Practical Approach, 1, 49 (1985)), ATriplicex (クローンテック社製), λ ExC (ファルマシア社製), pT7T3181 (ファルマシア社製), pCD2 (Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)), pUC18 (Gene, 33, 103 (1985)), pAMo (J. Biol. Chem., 268, 22782-22787 (1993)), 別名pAMoPRC3Sc (特開平05-336953); 等を用いることができる。

宿主菌として、大腸菌 *Escherichia coli* に属する菌を用いることができる。具体的には、*Escherichia coli* XL1-Blue MRF' (ストラタジーン社製, *Stratagies* 5, 81 (1992)), *Escherichia coli* CG600 (Genetics, 39, 440 (1954)), *Escherichia coli* Y1088 (Science, 222, 778 (1983)), *Escherichia coli* Y1090 (Science, 222, 778 (1983)), *Escherichia coli* NM522 (J. Mol. Biol., 165, 1 (1983)), *Escherichia coli* K802 (J. Mol. Biol., 118 (1968)), *Escherichia coli* JM105 (Gene, 33, 275 (1985)), *Escherichia coli* SOLRTM Strain (ストラタジーン社製), *Escherichia coli* LB392 (モレキュラー クローニング第2版) 等を用いることができる。

上記方法により作製したcDNAライブラリーに加え、市販のcDNAライブラリーも利用することができる。

市販のcDNAライブラリーとして、クローンテック社、ライフテックオリエンタル社等のヒト、ウシ、マウス、ラット、ウサギ等由来の各臓器cDNAライブラリーをあげることができる。

第433番目のバリン残基の領域は、hERR2と94%、hERR1と63%、hERと35%の相同性を示す。hERの対応するアミノ酸配列からなる領域はリガンド結合領域とされるが、該領域は核内レセプターファミリーで相対的な高い領域であることが知られている。

従って、ERR4がリガンド結合能およびDNA結合能を有することは明白である。

さらに、N末端領域において、ERR4はhERR2とは高い相同性を示すが、hERR1およびhERとは低い相同性を示す。核内レセプターのN末端領域は、転写制御領域であり、かつ該領域はファミリー間で相同性が比較的低い領域であることが知られている。

このように、ERR4のアミノ酸配列は、DNA結合領域、リガンド結合領域、転写制御領域等、核内レセプターに特徴的な構造を有している。

以上のように、配列番号2で示される塩基配列からなるDNAを一量取得され、その塩基配列が決定された後は、該塩基配列の5'端および3'端の塩基配列に添ったプライマーを調製し、ヒトまたは非ヒト動物の細胞、胎盤等の組織または細胞に含まれるmRNAから合成したcDNAあるいはcDNAライブラリーを反応として、PCR法(PCR Protocols, Academic Press (1990))を用いてDNAの増幅を行うことにより、本発明のDNAを取得することができる。

また、配列番号2で示されるDNAの全長あるいは一部をプローブとして、ヒトまたは非ヒト動物の細胞、胎盤等の組織または細胞に含まれるmRNAから合成したcDNAあるいはcDNAライブラリーに対してコロニーハイブリダイゼーションやブランクハイブリダイゼーション(モレキュラー・クローニング第2版)を行うことにより、本発明のDNAを取得することができる。

決定されたDNAの塩基配列に基づいて、フォスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社のDNA合成機model 392等のDNA合成機で化学合成することにより、本発明のDNAを取得することもできる。

取得したDNAについて、該DNAを含む複製ベクターを宿主細胞に導入して得られる複製細胞を用いて蛋白質を発現させることにより、または該DNA

作製したcDNAライブラリーからクローンを単離し、それぞれのクローンについてcDNAの塩基配列を決定し、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー(Sanger)等のジデオキシ法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977))あるいは373A-DNAシーケンサー(Perkin Elmer社製)等の塩基配列解析装置を用いて分析することにより、該DNAの塩基配列を決定する。

それぞれのcDNAの塩基配列が新規な配列かどうかは、BLAST等の相対性検索プログラムを用いて、GenBank、EMBLおよびDDBJ等の塩基配列データベースを検索することにより、データベース中の既知の塩基配列と一致すると考えられるような明らかな相同性を示す塩基配列がないことにより確認できる。

上記の方法で得られる新規なDNAの塩基配列として、例えば配列番号2で示される塩基配列をあげることができる。

配列番号2の140~1438番目に示される塩基配列からなるDNAのコードする、配列番号1で示されるアミノ酸配列からなる蛋白質(ERR4)は、ヒトエストロゲン関連レセプター(human Estrogen Related Receptor)であるhERR2およびhERR1(Nature, 331, 91-94 (1988))と、それぞれ95.6%および94.9%の相同性を有する。

配列番号1で示されるアミノ酸配列において、103番目のシステイン残基~168番目のメチオニン残基の領域は、hERR2と100%、hERR1と91%、hER(ヒトエストロゲンレセプター(human Estrogen Receptor))と73%の相同性をそれぞれ示す。

hERの対応するアミノ酸配列からなる領域は、ジック・フィンガー構造を有するDNA結合領域とされるが、該領域は核内レセプターファミリーで相対的な高い領域であることが知られている。ERR4においても、該領域に特徴的なジック・フィンガー構造を形成するために必要なシステイン残基の位置と数が完全に保存されている。

また、配列番号1で示されるアミノ酸配列において、208番目のプロリン残

がコードするアミノ酸配列とhERR2、hERR1またはhERのアミノ酸配列との相同性を比較することにより、該DNAがリガンド結合能およびDNA結合能を有する蛋白質をコードするDNAであることを確認することができる。

上述の方法で取得した本発明のDNAおよびDNA断片を用いて、常法あるいは上記のDNA合成機により、本発明のDNAの一部の配列を有するアンチセンス・オリゴヌクレオチド、センス・オリゴヌクレオチド等のオリゴヌクレオチドを調製することができる。またRNAを含むオリゴヌクレオチドを調製することもできる。

該オリゴヌクレオチドとしては、上記DNAの有する塩基配列中の連続した5~80塩基と同一配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができる。またこれらのDNAと相補的な配列を有するRNAも本発明のオリゴヌクレオチドである。

該オリゴヌクレオチドとして、例えば、配列番号2で示される塩基配列中の連続した5~80塩基と同一配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができる。センスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして用いる場合には、両者の融解温度(Tm)および塩基組成が概略的に異なることのない上記のオリゴヌクレオチドが好ましい。具体的には、配列番号3~5で示された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをあげることができる。

更に、これらオリゴヌクレオチドの誘導体(以下、オリゴヌクレオチド誘導体という)も本発明のオリゴヌクレオチドとして利用することができる。

オリゴヌクレオチド誘導体としては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5'ホスフォアミデート結合に置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がデオキシリボース結合に置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体

0. (1987)], pCDNA⁺/Amp (Invitrogen社製), pREP4 (Invitrogen社製), pAGE103 (J. Biochem. 1307 (1987)), pAGE210, pAMu, pAMoA等をあげることができる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれのものでも可なり、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SRαプロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

宿主細胞としては、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、ヒトの細胞であるナマルバ (Nemalwa) 細胞またはNemalwa K₁M-1細胞、ヒト胎児腎臓細胞、ヒト白血病細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBTS5637 (特開昭63-299) 等をあげることができる。

マウス・ミエローマ細胞としては、SP2/0、NS0等、ラット・ミエローマ細胞としてはYB2/0等、ヒト胎児腎臓細胞としてはHEK293 (ATCC: CRL-1573) 等、ヒト白血病細胞としてはBAL-1等、アフリカミドリザル腎臓細胞としてはCOS-1、COS-7等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれのものでも可なり、例えば、エレクトロポレーション法 (Cyto technology, 2, 133 (1990)), リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 51, 7413 (1987)), Virology, 52, 456 (1973) に記載の方法等をあげることができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばバキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ ア・ラボラトリー・マニュアル (Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)), モレキュラー・バイオロジー ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Biology, A Laboratory Manual), カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー, Bio/Technology, 5, 47 (1988) 等に記載された方法によって、蛋白質を発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共同導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1302, pVL1393, pBlueBac11 (ともにInvitrogen社製) 等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、痘疹科科昆虫に感染するウイルスであるアトグラファ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) 等を用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperda の卵巣細胞、Trichoplusia ni の卵巣細胞、カイコ卵巣由来の卵巣細胞等を用いることができる。

Spodoptera frugiperda の卵巣細胞としてはSf9, Sf21 (バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ ア・ラボラトリー・マニュアル) 等、Trichoplusia ni の卵巣細胞としてはHi5, BTI-TN-5B1-4 (インビトロジェン社製) 等、カイコ卵巣由来の卵巣細胞としては~~Spodoptera frugiperda~~ N4等をあげることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共同導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 51, 7413 (1987)) 等をあげることができる。

植物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、Tプラスミド、タバコモザイクウイルスベクター等をあげることができる。

プロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれのものでも可なり、例えば、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の35Sプロモーター、イネアクチン1プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、タバコ、ジャガイモ、トマト、ニンジン、ダイズ、アブラナ、アルファルファ、イネ、コムギ、オオムギ等の植物細胞等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であればいずれのものでも可なり、例えば、アグロバクテリウム (Agrobacterium tumefaciens) (特開昭59-140885、特開昭60-70080、WO94/00977)、エレクトロポレーション法 (特開昭60-251887)、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 (特許第2606855、特許第2517813) 等をあげることができる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法等に応じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

酵母、動物細胞、昆虫細胞または植物細胞により発現させた場合には、動物細胞に付加された蛋白質を得ることができる。

以上のようにして得られる融合転換体を培養に培養し、培養物中に本発明の蛋白質を生成・分泌させ、該培養物から採取することにより、本発明の蛋白質を得ることができる。

本発明の融合転換体を培養に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の培養に準じて行うことができる。

大腸菌等の宿主生物あるいは酵母等の宿主生物を宿主として得られた融合転換体を培養する培養地としては、該生物が消化し得る炭水化物、窒素源、無機塩類等を含有し、融合転換体の培養を効率的に行える培養地であれば天然培養地、合成培養地のいずれを用いてもよい。

炭水化物としては、該生物が消化し得るものであればよく、グルコース、フラク

トース、スクロース、これらを含有する培養液、デンプンあるいはデンプン加水分解物の炭水化物、脂肪、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニウム、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機物もしくは有機物のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、ならびに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、大豆卵および大豆加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。

無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸第二鉄、硫酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常培養培養または深部組織培養等の好ましい条件下で行う。培養温度は15~40℃がよく、培養時間は、通常16時間~7日間である。培養中のpHは3.0~9.0に保持する。pHの調整は、無機または有機の塩、アルカリ塩、炭酸、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

また、培養中に必要に応じて、アンピシリンまたはテトラサイクリン等の抗生物質を培養地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培養地に添加してもよい。例えば、lacZプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した菌を培養するときにはイソプロピルβ-D-チオガラクトピラノシド等を、lacZプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培養地に添加してもよい。

動物細胞を宿主として得られた融合転換体を培養する培養地としては、一般に用いられているRPMI1640培養地 [The Journal of the American Medical Association, 519 (1967)], EagleのMEM培養地 [Science, 501 (1952)], DMEM培養地 [Virology, 5, 395 (1959)], 199培養地 [Proceeding of the Society for

the Biological Medicine, 22, 1 (1950); またはこれら培養に牛胎児血清等を添加した培養等を用いることができる。

培養は、通常 pH 6~8、25~40℃、5% CO₂ 存在下等の条件下で 1~7 日間行う。

また、培養中に必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質を培養に添加してもよい。

胚細胞等を宿主として得られた形質転換体を培養する培養地としては、一般に使用されている DM-FH 培養地 (Pharmingen 社製)、SF-9001 SFM 培養地 (Life Technologies 社製)、ExCell 400、ExCell 405 (いずれも IRI Biosciences 社製)、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., Nature, 155, 788 (1962)) 等を用いることができる。

培養は、通常 pH 6~7、25~30℃等の条件下で、1~5 日間行う。

また、培養中に必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培養に添加してもよい。

植物細胞を宿主として得られた形質転換体は、細胞として、または細胞の細胞や器官に分化させて培養することができる。該形質転換体を培養する培養地としては、一般に使用されているムラシゲ・アンド・スカーグ (MS) 培養地、ホワイト (White) 培養地、またはこれら培養地にオーキシン、サイトカニン等、植物ホルモンを添加した培養地等を用いることができる。

培養は、通常 pH 5~9、20~40℃の条件下で 3~60 日間行う。

また、培養中に必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培養に添加してもよい。

上記のとおり、本発明の蛋白質をコードする DNA を組み込んだ遺伝子ベクターを含有する微生物、動物細胞、あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、該蛋白質を生産誘導させ、該培養物より該蛋白質を回収することにより、該蛋白質を製造することができる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クロニング第 2 版に記載されている方法等に応じて、分産生産、融合蛋白質発現等を行うこと

ができる。

本発明の蛋白質の生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させる蛋白質の構造を要することにより、該方法を選択することができる。

本発明の蛋白質が宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法 (J. Biol. Chem., 254, 17819 (1979))、ロウらの方法 (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 55, 8227 (1989)、Genea Develop., 1, 1285 (1990))、または特開 05-338963、WO 94/23021 号に記載の方法を参照することにより、該蛋白質を宿主細胞外に効率的に分泌させることができる。

即ち、遺伝子導入の手法を用いて、本発明の蛋白質の断片部位を含む蛋白質の平線にシグナルペプチドを付加した形で発現させることにより、本発明の蛋白質を宿主細胞外に効率的に分泌させることができる。

また、特開 2-227075 に記載されている方法に応じて、シールド膜形成完形細胞等を用いた遺伝子導入系を利用して生産品を上昇させることもできる。

さらに、遺伝子導入した動物または植物の細胞を分化させることにより、遺伝子が導入された動物胚体 (トランスジェニック胚体) または植物胚体 (トランスジェニック胚体) を造成し、これらの細胞を用いて本発明の蛋白質を製造することもできる。

形質転換体が動物細胞または植物細胞の場合は、通常の方法に従って、培養または栽培し、該蛋白質を生産誘導させ、該動物胚体または植物胚体より該蛋白質を回収することにより、該蛋白質を製造することができる。

植物細胞を用いて本発明の蛋白質を製造する方法としては、例えば公開の方法 (American Journal of Clinical Nutrition, 55, 839S (1996)、American Journal of Clinical Nutrition, 55, 427S (1996))、B

io/Technology, 2, 830 (1991)) に準じて遺伝子を導入して造成した動物中に本発明の蛋白質を生産する方法があげられる。

動物細胞の場合は、例えば、本発明の蛋白質をコードする DNA を導入したトランスジェニック胚体動物を飼育し、該蛋白質を該動物中に生産・蓄積させ、該動物中より該蛋白質を回収することにより、該蛋白質を製造することができる。該動物中の繁殖・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク (特開 03-309102)、卵等をあげることができる。この際用いられるプロモーターとしては、動物で発現できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳糖阻害特異的なプロモーターであるロカゼインプロモーター、ロカゼインプロモーター、ラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

植物細胞を用いて本発明の蛋白質を製造する方法としては、例えば本発明の蛋白質をコードする DNA を導入したトランスジェニック植物を公開の方法 (植維培養, 20 (1994)、植維培養, 21 (1995)、Trends in Biotechnology, 15, 45 (1997)) に準じて栽培し、該蛋白質を該植物中に生産・蓄積させ、該植物中より該蛋白質を回収することにより、該蛋白質を生産する方法があげられる。

本発明の形質転換体により製造された蛋白質を単離・精製する方法としては、通常の酵素の単離・精製法を用いることができる。

例えば、本発明の蛋白質が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液にけん液後、懸浮液を静置、フレンチプレス、マントンカウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破壊し、無細胞抽出液を得る。

該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、ろ過法、換液法、透析法、超濾法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE)-セファロース、DIAION HP A-75 (三洋化成社製) 等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose 4B (Pharmacia 社製) 等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロ

ース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーミング法、電泳法、電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせで用い、精製品を得ることができる。

また、該蛋白質が細胞内に不溶性を形成して発現した場合は、再溶解に細胞を回収破壊し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿物より、通常の方法により該蛋白質を回収後、該蛋白質の不溶性を該蛋白質変性剤で可溶性化する。

該可溶性液を、蛋白質変性剤を含まないあるいは蛋白質変性剤の濃度が該蛋白質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、該蛋白質を正常な条件範囲に精製させた後、上記と同様の単離精製法により精製品を得ることができる。

本発明の蛋白質あるいはその断片等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、通常上清に該蛋白質あるいはその断片付加体等の誘導体を取り出すことができる。

即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより可溶性成分を回収し、該可溶性成分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製品を得ることができる。

このようにして取得される蛋白質として、例えば、配列番号 1 に示される Amino 酸配列を有する蛋白質をあげることができる。

また、本発明のポリペプチドを他の蛋白質との融合蛋白質として生産し、融合した蛋白質に親和性をもつ物質を用いたアフィニティークロマトグラフィーを利用して精製することもできる。例えば、ロウらの方法 (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 55, 8227 (1989)、Genea Develop., 1, 1285 (1990))、特開 05-338963、WO 94/23021 号に記載の方法に準じて、本発明のポリペプチドをプロテイン A との融合蛋白質として生産し、イムノグロブリン C を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。

また、本発明のポリペプチドを Dia 酸ペプチドとの融合タンパク質として生産し、抗 Dia 酸抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製す

ることができる (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 27 (1989), Genes Develop., 4, 1258 (1990))。更に、該ポリペプチド自身に対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製することもできる。

上記で取得された蛋白質のアミノ酸配列を基に、Fmoc法 (フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、t-Boc法 (tert-ブチルオキシカルボニル法) 等の化学合成法により、本発明の蛋白質を製造することができる。また、Advanced ChemTech社、パーキン・エルマー社、Pharmacia社、Protein Technology Instrument社、Synthecell-Vega社、PerSeptive社、総括製作所等のペプチド合成機を利用して化学合成することもできる。

3. 本発明の蛋白質を認識する抗体の調製

(1) ポリクローナル抗体の作製

本発明の蛋白質または該蛋白質の部分断片ポリペプチドの精製品、あるいは本発明の蛋白質の一部のアミノ酸配列を有するペプチドを抗原として用い、動物に投与することによりポリクローナル抗体を作製することができる。

投与する動物として、ウサギ、ヤギ、ラット、マウス、ハムスター等を用いることができる。

該抗原の投与量は動物1匹当たり50~100 μ gが好ましい。

ペプチドを用いる場合は、ペプチドをスカシガイヘモシアニン (keyhole limpet haemocyanin) や牛赤血球グロブリン等のキャリア蛋白質に共有結合させたものを抗原とするのが好ましい。抗原とするペプチドは、ペプチド合成機で合成することもできる。

該抗原の投与は、1回目の投与の後1~2週間おきに3~10回行う。各投与後、3~7日目に陽性反応より採血し、採血量が免疫に用いた抗原と反応することを陽性反応判定法 (酵素免疫測定法 (EISA法) : 医学抄訳 (1976年), Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)) 等で確認する。

免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した非ヒト哺乳動物より血清を取得し、該血清より、下記方法によりポリクローナル抗体を分離、精製することができる。

抗体を分離、精製する方法としては、遠心分離、40~50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸塩析 (Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988))、またはDEAE-セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインA-カラム、プロテインG-カラムあるいはゲル透過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて処理する方法があげられる。

(2) モノクローナル抗体の作製

(a) 抗体産生細胞の調製

上記(1)において、免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示したラットを抗体産生細胞の供給源として供する。

該抗体価を示したラットに抗原物質を腹腔投与した後3~7日目に、脾臓を摘出する。

脾臓細胞をMEM培養 (日本薬業社) 中で培養し、ピンセットでほぐし、1,200 rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

得られた沈殿部分の細胞をトリスメタン化アンモニウム緩衝液 (pH7.65) で1~2分間懸濁し赤血球を除去した後、MEM培養で3回洗浄し、得られた脾細胞を抗体産生細胞として用いる。

(b) 骨髄腫細胞の調製

骨髄腫細胞としては、マウスまたはラットから摘出した腫瘍細胞を使用する。例えば、8-アザグアニン耐性マウス (BALB/c由来) 骨髄腫細胞株P3-X63Ag8-U1 (以下、P3-U1と略す) (Curr. Topics, Microbiol., Immunol., 31, 1 (1978), Buron, J. Immunol., 131 (1978)), SP2/0-Ag14 (SP-2) (Nature, 255, 269 (1978)), P3-X63-Ag8 653 (663) (J. Immunol., 123, 1548 (1979))、

P3-X63-Ag8 (X63) (Nature, 255, 495 (1975)) 等を用いることができる。これらの細胞株は、8-アザグアニン培地 (RPMI-1640培地にグルタミン (1,5 mmol/l)、2-メルカプトエタノール (5 $\times 10^{-5}$ mol/l)、ジェンタマイシン (10 μ g/ml) および牛胎児血清 (FCS) (CSL社製, 10%) を加えた培地 (以下、正常培地という) に、さらに8-アザグアニン (15 μ g/ml) を加えた培地で選別するが、細胞融合の3~4日前に正常培地で培養し、融合には該細胞を 2×10^7 個以上用いる。

(c) ハイブリドーマの作製

(a) で取得した抗体産生細胞と (b) で取得した骨髄腫細胞をMEM培地またはPUS (リン酸二ナトリウム1.83g、リン酸一カリウム0.21g、食塩7.65g、蒸留水1リットル、pH7.2) でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞:骨髄腫細胞=5~10:1になるよう混合し、1,200 rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

得られた沈殿部分の細胞をよくほぐし、該細胞群に、緩衝液に、37℃で、 10^6 抗体産生細胞あたり、ポリエチレングライコール-1000 (PEG-1000) 2g、MEM2mlおよびジメチルスルホキシド (DMSO) 11.7mlを混合した溶液を0.2~1ml添加し、さらに1~2分間MEM培地1~2mlを放回添加する。

添加後、MEM培地を加えて全量が50mlになるように調整する。該溶液を900 rpmで5分間遠心分離後、上清を捨てる。

得られた沈殿部分の細胞を、ゆるやかにほぐした後、メスピペットによる選別、吸出しでゆるやかにHAT培地 (正常培地にヒポキサンチン (10 $^{-4}$ mol/l)、チミジン (1.5 $\times 10^{-5}$ mol/l) およびアミノプテリン (4 $\times 10^{-7}$ mol/l) を加えた培地) 100ml中に懸濁する。

該懸濁液を96穴培養プレートに100 μ l/穴ずつ分注し、5%CO₂インキュベーター中、37℃で7~14日間培養する。

培養後、培養上清の一部をとりアンチボディーズ (Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbo

r Laboratory, Chapter 14 (1988)) 等に述べられている酵素免疫測定法により、本発明の蛋白質の部分断片ポリペプチドに特異的に反応するハイブリドーマを選択する。

酵素免疫測定法の具体的な例として、以下の方法をあげることができる。

免疫の陽、抗原に用いた本発明の蛋白質の部分断片ポリペプチドを適当なプレートにコートし、ハイブリドーマ懸液上清もしくは後述の(d)で得られる精製抗体を第一抗体として反応させ、さらに第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗ラットまたは抗マウスIgGグロブリン抗体を反応させた後に標識物質に反応した抗体を行い、本発明の蛋白質に特異的に反応するものを本発明のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

該ハイブリドーマを用いて、陽性検出法によりクローニングを2回繰り返して1回目、HT培地 (HAT培地からアミノプテリンを除いた培地)、2回目は、正常培地を使用する)、安定して強い抗体価の認められたものを本発明のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ株として選択する。

(d) モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理 (2, 6, 10, 14-テトラメチルベンタデカン (Prisane) 0.5mlを腹腔内投与し、2週間飼育する) した8~10週齢のマウスまたはメッドマウスに、(c) で取得した本発明の蛋白質モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞5~20 $\times 10^6$ 細胞/匹を腹腔内に注射する。10~21日間ハイブリドーマは宿主に寄生する。

該宿主に寄生したマウスから腹水を採取し、3000 rpmで5分間遠心分離して固形物を除去する。

得られた上清より、ポリクローナル抗体で用いた方法と同様の方法でモノクローナル抗体を精製、取得することができる。

抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体タイピングキットを用いて行う。抗体質量は、ローリー法あるいは280nmでの吸光度より算出する。

抗体のクラスとは抗体のアイソタイプのことで、ヒトでは、IgG、IgA、

IGM、IGD、IGEがあげられる。サブクラスとは、クラス内のアイソタイプのことで、マウスでは、IGG1、IGG2a、IGG2b、IGG3、ヒトでは、IGG1、IGG2、IGG3、IGG4があげられる。

1. 本発明のDNA、蛋白質または抗体の利用

(1) 本発明のDNAまたはオリゴヌクレオチドを用いた、ハイブリダイゼーション法、またはポリメラーゼ・チェイン・リアクション(PCR)法による遺伝子発現の検出

本発明のDNAまたはオリゴヌクレオチドを用い、ノーザンハイブリダイゼーション法(モレキュラー・クローニング第2版)、PCR法およびRT(reverse-transcription)-PCR法(ともにPCR Protocols, Academic Press (1990))、(以上、併せてPCR法ともいう)等を行うことにより、本発明の蛋白質をコードするmRNAの発現を検出することができる。このうち、RT-PCR法は簡便な方法であるため、検出方法として特に有効である。

検出方法は、遺伝子の発現量の測定にも用いられ、また炎症、癌、骨関節痛、糖尿病、腎疾患等、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の発現が原因となっている疾患の診断に利用することができる。

(2) 本発明のDNAまたはオリゴヌクレオチドを用いた、ハイブリダイゼーション法またはPCR法による、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の発現の検出

本発明のオリゴヌクレオチドをプローブとして、ゲノムDNAに対してサザンハイブリダイゼーション法(モレキュラー・クローニング第2版)、PCR法等を行うことにより、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の発現を検出することができる。

検出方法は、炎症、癌、骨関節痛、糖尿病、腎疾患等、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の発現が原因となっている疾患の診断に利用することができる。

(3) 本発明のDNAまたはオリゴヌクレオチドを用いた本発明の蛋白質をコードする遺伝子の転写または翻訳の抑制

本発明のDNAは、アンチセンスRNA/DNA技術(バイオサイエンスとイ

ンダストリー、59、322(1992)、化学、59、881(1991)、Biotechnology、59、358(1992)、Trends in Biotechnology、59、87(1992)、Trends in Biotechnology、59、152(1992)、遺伝子、59、1463(1997)、トリプル・ヘリックス技術(Trends in Biotechnology、59、132(1992))等を用い、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の転写または翻訳を抑制することができる。

例えば、本発明のDNAまたはオリゴヌクレオチドを投与することにより、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の転写、または本発明の蛋白質をコードするmRNAの翻訳を、それぞれ抑制でき、本発明の蛋白質の産生を抑制することができる。

該抑制方法は、炎症、癌、骨関節痛、糖尿病、腎疾患等、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の発現が原因となっている疾患の治療または予防に利用することができる。

本発明の蛋白質をコードする遺伝子の発現が原因となっている疾患の治療方法としては、患者から取り出した細胞に、遺伝子治療用に適切に調整した本発明の組換えベクターを導入した後、細胞を患者内に戻すことにより、また適当なレトロウィルス、アデノウィルス、アデノ随伴ウィルス、単純ヘルペスウィルス、レンチウィルス等のウィルスベクターに乗せて患者に投与することにより、さらにリポソーム等の人工的なベシクル構造に封入して患者に投与することにより、本発明の蛋白質を産む細胞の体内で発現させる方法が用いられる。

なお、本発明の蛋白質、例えばERR4はERR2と高い相対性を示すが、ERR2はグルココルチコイド等の抗炎症作用を阻害する可能性がある(1、Biochem.、271、9879(1996))ことから、ERR4の発現を抑制すると抗炎症物質の作用を増強できることが推定される。また、ERR4は腎臓で発現していることから、炎症または腎疾患、例えば腎炎の有用な治療薬となり得る。

(4) 本発明のDNAまたはオリゴヌクレオチドを用いた本発明の蛋白質をコードする遺伝子のプロモーター領域の取得

本発明のDNAまたはオリゴヌクレオチドをプローブとして、公知の方法(京都大学医学部研究開発研究部、新薬開発学実験プロトコル、秀雄社(1993年))を用いて、該遺伝子のプロモーター領域を識別することが可能である。

プロモーター領域としては、哺乳動物細胞において本発明の蛋白質をコードする遺伝子の転写に関与するすべてのプロモーター領域があげられる。例えば、ヒトの腎臓、肝臓、心臓、脳、腎臓、骨関節または膵臓、特に腎臓または肝臓で、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の転写に関与するプロモーター領域をあげることができる。該プロモーターは後述のスクリーニング方法に利用することができる。

(5) 本発明の蛋白質を用いた抗原抗体と特異的に結合するリガンドのスクリーニング

本発明の蛋白質と抗原抗体を反応させる方法、該蛋白質の立体構造に基づく薬剤デザインの方法等の方法(Charlton, P. S., Practical Application of Computer-Aided Drug Design, Marcel Dekker (1997))を用いることにより、該蛋白質と特異的に結合するリガンドをスクリーニングすることができる。該リガンドは本発明の蛋白質が関与する疾患の治療薬、または本発明の蛋白質が関与する情報伝達系や生体機能に関する研究に利用することができる。

(6) 本発明の形質転換体を用いた本発明の蛋白質をコードする遺伝子の発現の解析

本発明の形質転換体を種々の複製物質と共存させ、該複製物質における遺伝子の複製レベルを解析することにより、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の転写を制御する物質、本発明の蛋白質による転写調節機能に関与する物質、または本発明の蛋白質により転写調節を受ける遺伝子をスクリーニングすることができる。

また、胚幹の核内レセプターをコードする遺伝子やその胚の転写因子遺伝子と本発明をさせることにより、それらとの相互作用を決定することができ、同時にこれら遺伝子との相互作用に関与する物質をスクリーニングすることができる。

これらの方法において、既存の核内レセプターを転写因子の標的DNA配列を転写制御領域に有するCAT(クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ)遺伝子、GFP(グリーンフルオロセントプロテイン)遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子等のレポーター遺伝子を用いると、スクリーニング効率をあげることができる。

(7) 本発明の抗体を用いた本発明の蛋白質の免疫学的検出

本発明の抗体を用い、抗原抗体反応を行わせることにより、本発明の蛋白質または該蛋白質を含む細胞を免疫学的に検出することができる。

該検出方法は、炎症、癌、骨関節痛、糖尿病、腎疾患等、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の発現が原因となっている疾患の診断に利用することができる。また、該検出方法は、蛋白質の定量にも用いることができる。

免疫学的に検出する方法としては、マイクロタイタープレートを用いるELISA法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法等をあげることができる。

免疫学的に定量的方法としては、該細胞で本発明の蛋白質と反応する抗体のうちエпитープが異なる2種類のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法、1281等の放射能性抗体で標識した本発明の蛋白質と本発明の蛋白質を認識する抗体とを用いるラジオイムノアッセイ法等があげられる。

(8) 本発明の抗体を含む医薬品

本発明の抗体は、医薬品、例えば炎症、癌、骨関節痛、糖尿病、腎疾患等、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の発現が原因となっている疾患の治療薬として用いることができる。

本発明の抗体を含む医薬品は、治療薬として該化合物製剤で投与することと可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の抗体と一緒に配合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製剤した医薬品製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができる。投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、経腸剤

、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

錠口役々に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。例えば乳剤およびシロップ剤のような液体制剤は、水、シロップ、ソルビトール、果糖等の糖質、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の植物油、 μ -ヒドロキシ安息香酸エステル塩等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の低分子糖、デンプン、アルブミン酸ナトリウム等の固形剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の固形剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、難消化エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

非親口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。例えば、注射剤は、塩酸塩、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる剤形等を用いて調製する。座剤は立方牙膠、水酸化鋳酸またはカルボン酸等の増粘剤を用いて調製される。また、噴霧剤は基化合物そのもの、ないしは受容体の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該化合物を液相な粒子として分散させ吸収を容易にさせる剤形等を用いて調製する。剤形として具体的には乳剤、グリセリン等が例示される。該化合物および用いる剤形の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の剤形が引当である。また、これら非親口剤においても、従来口剤で後加剤として例示した成分を添加することもある。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、
体形等により異なるが、通常成人1日当たり $10\text{ mg/kg} \sim 8\text{ mg/kg}$ である。
る。

(9) 本発明のpDNAを用いたノックアウト非ヒト動物の作製

本発明のDNAを含有している組換えベクターを用い、目的とする非ヒト動物、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ニワトリ等の胚性幹細胞(embryonic stem cell)において、染色体上の本発明の蛋白質をコードする遺伝子を公知の相同性挿入の手法(例えば、Nature, 325, 26

足明の脈血質に起因する種々の疾患の症状を消解することができる。

このように、本発明のノックアウト非ヒト遺伝子は、本発明の胚白質に起因する種々の疾患の診断や予防において極めて有用な動物モデルとなる。特にその胎盤、胎膜、胎動脈、また癌増進食品、健康食品等の評価用モデルとして非常に有用である。

説明を実施するための取組の取組

以下、本発明の実施例を示す。

実験例1 エストロゲン関連レセプター (Estrogen Related Receptor) 遺伝子発現の検出

(1) GenBankデータベースによるRSTクローンの検索
ヒトERK2 (アクセッション番号: X51417) の塩基配列をもとに、塩基配列データベースGenBank中の塩基配列との相同性を解析プログラムBLASTを用いて解析した。その結果、ヒトERK2と高い相対性のあるEST (Expressed Sequence Tag) が4つ見出された。そのクローン名とアクセッション番号は、それぞれ、ys69h11, r1 (H82542)、ys69h11, s1 (H82543)、ys81d07, s1 (H91842)、ys81d07, r1 (H91890) であった。また、これらのクローンのmRNAサイズはすべて、ヒト顕微鏡であった。

H82543とH91842とは94.1%、H91890とH82542とは95.3%と、それぞれ高い相関性を示し、ほとんど一致していると考えられる。一方、ヒトERR2とH82543、ヒトERR2とH91842とを比較すると、ヒトERR2の5'端で高い相関性を示し、その値はそれぞれ84.1%、84.0%であった。しかも、ヒトERR2塩基配列の82bpから85bpにかけて、H82543、H91842の14bpであると示されていることから、このES-DNAはERR2とは別の遺伝子の一部位であると考えられる。

また、ヒトERR2とH91800の相補鎖、およびヒトERR2とH82542の相補鎖とを比較すると、ヒトERR2の350bp~700bp付近で高い相同性を示し、その値はそれぞれ88.6%, 87.1%であった。

このことから、このEST群はEXR2とは別の遺伝子の一部をコードしてい

、6110、295 (1987)、Cell、51、3、503 (1987) 等) により不活化または任意の配列と置換した複製クローンを作製する (例えば、Nature、355、6315、243 (1991))。

胚性外細胞の遺伝クローンを利用、動物の受精卵の胚盤胞(h1nascy
set)への注入キメラ法または融合キメラ法等の手法により、胚性外細胞クロー
ンと正常細胞からなるキメラ個体を調製することができる。

後キメラ細胞と正常細胞の掛け合わせにより、全身の細胞の染色体上の本発明の蛋白質をコードする遺伝子に欠陥の発現を有する個体を得ることができ、さらにその個体の掛け合わせにより相同染色体の双方に欠陥が入ったホモ細胞の中から、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の発現が一部または完全に抑制された細胞としてノックアウト非ヒト動物を得ることができる。

また、染色体上の本発明の遺伝質をコードする遺伝子の位置の改変へ変異を導入することにより、ノックアウト非ヒト動物を作製することも可能である。例えば染色体上の本発明の遺伝質をコードする遺伝子の隣接領域中に塩基置換、欠失、挿入等させて変異を導入することにより、その産物の活性を改変させることも可能である。また、その発現制御領域への同様な変異を導入することにより、発現の程度、時期、組織特異性等を改変させることも可能である。さらにCre-loxP系との組合せにより、より複雑にも発現時期、発現部位、発現量等を制御することも可能である。

このような例として、脳のある特定の領域で発現されるプロモーターを利用して、その領域でのみ目的遺伝子を欠失させた例〔Cell, 52, 7, 1317 (1996)〕やCraを発現するアデノウィルスを用いて、目的の時期に、脳特定のみに目的遺伝子を欠失させた例〔Science, 275, 5335 (1997)〕が知られている。

従つて、染色体上の本発明の蛋白質をコードする遺伝子についても、このように任意の時間や組織で発現を制御できる。または染色体の挿入、欠失、脱離をその遺伝領域や発現制御領域に有する、ノックアウト非ヒト動物を作製することができる。

ノックアウト非ヒト動物は、任意の時期、任意の程度または任意の部位で、本

ると考えられ、その遺伝子を $ER\ R\ 4$ と命名した。H 8 2 5 4 3、H 9 1 8 4 2 は $ER\ R\ 4$ の 5' 端付近、H 8 2 5 4 2、H 9 1 8 9 0 はそれより 3' 側の塩基配列を置換していると考えられる。

(2) cDNAライブラリーからの検出

実験にERR4遺伝子を取得するためのcDNAライブラリーは、ESTクローンの由来に従い、Clontech社のHuman Retinac 5'-5' TREXCH cDNA libraryを使用した。

対数増殖期の大腸菌C600H(1株1Clontech社製)を10mmのiノ1直経マグネシウム培液中に懸濁し、約3万プラークのファージを添加して、37℃で15分間培養後、N2Y Top Agarで150mmシャーレに該溶液をプレーティングした。計12枚のシャーレ分を作製して、それぞれ5mm縦断線(5.0mmol/lトリリス塩酸(pH7.5)、1.00mmol/l塩化ナトリウム、8mmol/l硫酸マグネシウム、0.01%ゼラチン)を用いてファージ感染をシャーレごとに行ない、cDNAライブラリーフラクションとした。

ERR3と比較し、ERR4に特異的な塩基配列である、配列番号3に示す塩基配列を有するプライマーERR4-01および配列番号4に示す塩基配列を有するプライマーERR4-03を設計した。プライマーERR4-01は、EST配列H82543の84bpから107bpに、また、プライマーERR4-03は、EST配列H91890の70bpから93bpに、それぞれ対応して

このプライマーERR4-01とERR4-03とを用いて、cDNAライブラリーフラクションを模範としてPCRを行った。

該PCRにより増幅がみられたフラクションを、1枚あたり約3万ブランクを
おさめようとして、1.50mmのシャーレにブレイティングした。

生じたブラークのファージをHybond-N⁺メンブレン (Amersham 社製) にトランスブアーし、このメンブレンに対しブラーク・ハイブリダイゼーションを行った。

プローブは、プライマーERR4-01とプライマーLKK4-03をもとに、PCR DIGプローブ合成キット (Boehringer Mannheim

m社製)を用いてジボキシゲニン⁽¹⁾は滅したものを加えた。反応は、ハイブリダイゼーション溶液(5×SSC(750mmol/l塩化ナトリウム、75mmol/lクエン酸ナトリウム(pH7.0))、1.0%硫酸ハイブリダイゼーション用ブロッキング試薬(Bioehringer Mannheim社製)、0.1% N-ラウロイルサルコシン、0.02% SDS)中、65℃で一晩行った。

ハイブリダイゼーション後のフィルターを0.1% SDSを含む0.1倍濃度のSSCにより、58℃、15分間の条件で2回洗浄した後、アルカリフォスファターゼ結合抗DIG抗体、化学発光試薬CSPDからなるDIG発光検出キット(Bioehringer Mannheim社製)で処理し、化学発光フィルム(Hyperfilm-ECL; Amersham社製)を感光させてシグナルの検出を行った。

検出されたシグナルに相当するブラークを5M塩酸に処理し、再度、シングルブラークが検出できるようにシャーレにブレーティングした。

生じたブラークに対して、上記と同様の操作を行い、ハイブリダイゼーションによるシグナルの検出を行った。

シグナルのあったシングルブラークを5M塩酸に処理し、そこからLambdoid Midic Kit (QIAGEN社製)を用いてファージDNAを準備した。

ここで用いたライブラリーはλgt10ベクターを使用しており、クローンのcDNAは $\overrightarrow{5'}$ → $\overrightarrow{3'}$ サイトに挿入されているはずなので、ファージDNAを $\overrightarrow{5'}$ → $\overrightarrow{3'}$ で切断しインサートDNAを、同じくpBiscript II SK (+) (STRATAGENE社製)を $\overrightarrow{5'}$ → $\overrightarrow{3'}$ で切断したベクターとライゲーションしてサブクロニングを行った。

実施例2 塩基配列の決定

実施例1で得たクローンのcDNAの5'末端からの塩基配列をパーキン・エルマー社のDNAシーケンサー377を用いて決定した。

塩基配列の決定は、パーキンエルマー社のキットを使用し、該キットの指示に従って行った。

決定された塩基配列について、塩基配列データベースGenBank中の既知遺伝子の塩基配列との相関性を解析プログラムBLASTを用いて解析したところ、ESTと一致する以外、他の既知遺伝子とは一致しなかった。

このクローンは、膜内レセプター、特にヒトERR1、ERR2、ERR3と相関性をもつので、該クローンにコードされる蛋白質をERR4とした。配列番号1にERR4のアミノ酸配列を配列番号2にその塩基配列を示す。

ERR4をコードするcDNAを含むプラスミドpERR4を発育する大腸菌E. coli BL5 α/pERR4は、ERR4 cDNAとして、平成11年1月7日付で工業技術院生命工学基礎研究所、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号(郵便番号305-8566)に寄託されている。

実施例3 ERR4遺伝子の発現組織での発現

ヒト各種組織(心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨髄、腎臓、脾臓、膵臓、胸腺)のpoly(A)⁺ mRNA (Clontech社製)1μgから、Super Script Preamplification System (GIBCO BRL社製)を用いて、それぞれのcDNAを合成した。具体的な手順は、このキットの指示に従い、最終濃度1mlの水に溶解させた。

該断片を5倍に希釈し、該希釈液5.0μlを用い、RT-PCRを行った。

プライマーは、ERR4のオープン・リーディング・フレームを含む領域が増幅でき、ERR4特異的な配列である、配列番号5に示す塩基配列を有するプライマーERR4-07、配列番号6に示す塩基配列を有するプライマーERR4-06の2種類を用いた。

ERR4-07は、配列番号2の塩基配列の807bpから829bpに対応しており、ERR4-06は、配列番号2の塩基配列の1470bpから1493bpの相補鎖に対応している。

94℃の変性を1分間、62℃のアニーリングを1分間、72℃の伸長を2分間の反応を1サイクルとし、該サイクルを35回繰り返してPCRを行い、その増幅産物に対し、アガロースゲル電気泳動を行った。

結果を図1に示す。

肝臓と脾臓由来のcDNAから、約0.7kbの特異的なバンドが検出された。従って、ERR4遺伝子は、主に肝臓と脾臓で特異的に発現していることが判明した。

発現上の利用可能性

本発明によれば、癌、癌、骨関節症、糖尿病、腎臓病等の治療薬の開発、研究に有用なリガンド結合能およびDNA結合能を有する蛋白質、該蛋白質をコードするDNA、該蛋白質を認識する抗体、およびこれらの利用方法を提供することができる。

(配列表)

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOSYO CO., LTD.,

<120> NOVEL PROTEIN

<130> 11177WO1

<140>

<141>

<150> H11-007228

<151> 1999-01-14

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 433

<212> PRY

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ser Ser Asp Asp Arg His Leu Gly Ser Ser Cys Gly Ser Phe Ile
1 5 10 15

Lys Thr Glu Pro Ser Ser Pro Ser Ser Gly Ile Asp Ala Leu Ser His
20 25 30

(10) WO00/12180

His Ser Pro Ser Gly Ser Ser Asp Ala Ser Gly Gly Phe Gly Leu Ala
35 40 45

Leu Gly Thr His Ala Asn Gly Leu Asp Ser Pro Pro Met Phe Ala Gly
50 55 60

Ala Gly Leu Gly Gly Thr Pro Cys Arg Lys Ser Tyr Glu Asp Cys Ala
65 70 75 80

Ser Gly Ile Met Glu Asp Ser Ala Ile Lys Cys Glu Tyr Met Leu Asn
85 90 95

Ala Ile Pro Lys Arg Leu Cys Leu Val Cys Gly Asp Ile Ala Ser Gly
100 105 110

Tyr His Tyr Gly Val Ala Ser Cys Glu Ala Cys Lys Ala Phe Phe Lys
115 120 125

Arg Thr Ile Gln Gly Asn Ile Glu Tyr Ser Cys Pro Ala Thr Asn Glu
130 135 140

Cys Glu Ile Thr Lys Arg Arg Arg Lys Ser Cys Gln Ala Cys Arg Phe
145 150 155 160

Met Lys Cys Leu Lys Val Gly Met Leu Lys Glu Gly Val Arg Leu Asp
165 170 175

Arg Val Arg Gly Gly Arg Gln Lys Tyr Lys Arg Arg Leu Asp Ser Glu
180 185 190

(17) WO00/12180

Ser Ser Pro Tyr Leu Ser Leu Gln Ile Ser Pro Pro Ala Lys Lys Pro
195 200 205

Leu Thr Lys Ile Val Ser Tyr Leu Leu Val Ala Glu Pro Asp Lys Leu
210 215 220

Tyr Ala Met Pro Pro Pro Gly Met Pro Glu Gly Asp Ile Lys Ala Leu
225 230 235 240

Thr Thr Leu Cys Asp Leu Ala Asp Arg Glu Leu Val Val Ile Ile Gly
245 250 255

Trp Ala Lys His Ile Pro Gly Phe Ser Ser Leu Ser Leu Gly Asp Gln
260 265 270

Met Ser Leu Leu Gln Ser Ala Trp Met Glu Ile Leu Ile Leu Gly Ile
275 280 285

Val Tyr Arg Ser Leu Pro Tyr Asp Asp Lys Leu Val Tyr Ala Glu Asp
290 295 300

Tyr Ile Met Asp Glu Glu His Ser Arg Leu Ala Gly Leu Leu Glu Leu
305 310 315 320

Tyr Arg Ala Ile Leu Gln Leu Val Arg Arg Tyr Lys Lys Leu Lys Val
325 330 335

Glu Lys Glu Glu Phe Val Thr Leu Lys Ala Leu Ala Leu Ala Asn Ser
340 345 350

(18) WO00/12180

Asp Ser Met Tyr Ile Glu Asp Leu Glu Ala Val Gln Lys Leu Gln Asp
355 360 365

Leu Leu His Glu Ala Leu Gln Asp Tyr Glu Leu Ser Gln Arg His Glu
370 375 380

Gln Pro Trp Arg Thr Gly Lys Leu Leu Leu Thr Leu Pro Leu Leu Arg
385 390 395 400

Gln Thr Ala Ala Lys Ala Val Gln His Phe Tyr Ser Val Lys Leu Gln
405 410 415

Gly Lys Val Pro Met His Lys Leu Phe Leu Glu Met Leu Glu Ala Lys
420 425 430

Val

<210> 2
<211> 1996
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (140)..(1438)

<400> 2
gaattccggc actgctctt cccgtgatt tcccgccgt cttctctac caactgggaa 60

(19) WO00/12180

tgtctaaacg ggaactgagg acgtgtccga actctgcata ccggaccccc tccgtctacca 120

caaccagctg ctgaacagg atg tcc tcg gac agc cac ctg ggc tcc agc 172
Met Ser Ser Asp Arg His Leu Gly Ser Ser
1 6

10

tgc ggc tcc ttc atc aag act gag ccg tcc agc ccg tcc tcg ggc atc 220
Cys Gly Ser Phe Ile Lys Thr Glu Pro Ser Ser Pro Ser Gly Ile
15 20 25

gat gcc ctg agc cac cac agc ccc agt ggc tcg tcc gac gcc agc ggc 268
Asp Ala Leu Ser His His Ser Pro Ser Gly Ser Ser Asp Ala Ser Gly
30 35 40

ggc ttt ggc ctg gcc ctg ggc acc cac gcc aac ggt ctg gac tcg cca 316
Gly Phe Gly Leu Ala Leu Gly Thr His Ala Asn Gly Leu Asp Ser Pro
45 50 55

ccc atg ttt gca ggc gcc ggg ctg gga ggc acc cca tgc cgc aag agc 364
Pro Met Phe Ala Gly Ala Gly Leu Gly Gly Thr Pro Cys Arg Lys Ser
60 65 70 75

tac gag gac tgt gcc agc ggc atc atg gag gac tcg gcc atc aag tgc 412
Tyr Glu Asp Cys Ala Ser Gly Ile Met Glu Asp Ser Ala Ile Lys Cys
80 85 90

gag tac atg ctg nac gcc atc ccc aag cgc ctg tgc ctg gtc ggc 460
Glu Tyr Met Leu Asn Ala Ile Pro Lys Arg Leu Cys Leu Val Cys Gly
95 100 105

500
(1)
gac att gcc tct ggc tac cac tac ggc gtc gcc tcc tgc gag gct tgc 508
Asp Ile Ala Ser Gly Tyr His Tyr Gly Val Ala Ser Cys Glu Ala Cys
110 115 120
aag gcc ttc ttc aag agc act atc caa ggc aac att gag tac agc tgc 558
Lys Ala Phe Phe Lys Arg Thr Ile Gln Gly Asn Ile Glu Tyr Ser Cys
125 130 135
ccg gcc acc aac gag tgc gag atc acc aac ggc agc cgc aag tcc tgc 604
Pro Ala Thr Asn Glu Cys Glu Ile Thr Lys Arg Arg Lys Ser Cys
140 145 150 155
cag gcc tgc cgc ttc atg aac tgc ctc aac gtc ggc atg ctg aag gaa 652
Gln Ala Cys Arg Phe Met Lys Cys Leu Lys Val Gly Met Leu Lys Glu
160 165 170
ggc gtc cgc ctt gat cga gtc cgt gga ggc cgt cag aac tac aag cga 700
Gly Val Arg Leu Asp Arg Val Arg Gly Gly Arg Gln Lys Tyr Lys Arg
175 180 185
cag ctg gac tca gag agc agc cca tac ctg agc tta caa att tet cca 748
Arg Leu Asp Ser Glu Ser Ser Pro Tyr Leu Ser Leu Gln Ile Ser Pro
190 195 200
cct gct aac aag cca ttg acc aag att gtc tca tac cta ctg gtc gct 798
Pro Ala Lys Lys Pro Leu Thr Lys Ile Val Ser Tyr Leu Leu Val Ala
205 210 215
gag ccg gac aag ctc tat gcc atg cct ccc cct ggt atg cct gag ggc 844

611
Glu Pro Asp Lys Leu Tyr Ala Met Pro Pro Pro Gly Met Pro Glu Gly
220 225 230 235
gac atc aag gcc ctg acc act ctc tgt gac ctg gca gac cga gag ctt 892
Asp Ile Lys Ala Leu Thr Thr Leu Cys Asp Leu Ala Asp Arg Glu Leu
240 245 250
gtg gtc atc att ggc tgg gcc aag cac atc cca ggc ttc tca agc ctc 940
Val Val Ile Ile Gly Trp Ala Lys His Ile Pro Gly Phe Ser Ser Leu
255 260 265
tcc ctg ggc gac cag atg agc ctg ctg cag agt gcc tgg atg gaa atc 988
Ser Leu Gly Asp Gln Met Ser Leu Leu Gln Ser Ala Trp Met Gln Ile
270 275 280
ctc atc ctg gcc atc gtc tac cgc tgg ctg ccc tac gac gac aag ctg 1036
Leu Ile Leu Gly Ile Val Tyr Arg Ser Leu Pro Tyr Asp Asp Lys Leu
285 290 295
gtg taa gct gag gac tac atc atg gat gag gag tac tcc cgc ctc ggc 1084
Val Tyr Ala Glu Asp Tyr Ile Met Asp Glu Glu His Ser Arg Leu Ala
300 305 310 315
ggc ctg ctg gag ctc tac cgc gcc atc ctg cag ctg gta cgc agc tac 1132
Gly Leu Leu Glu Leu Tyr Arg Ala Ile Leu Gln Leu Val Arg Arg Tyr
320 325 330
aag aag ctc aag gtc gag aag gag gag ttt gtc aag ctc aag gcc ctg 1180
Lys Lys Leu Lys Val Glu Lys Glu Glu Phe Val Thr Leu Lys Ala Leu
335 340 345

521
W000/11180
gac ctc gcc aac tcc gat tcc atg tac atc gag gat oia gag gct gtc 1228
Ala Leu Ala Asn Ser Asp Ser Met Tyr Ile Glu Asp Leu Glu Ala Val
350 355 360
cag aag ctg cag gac ctg ctg cgc gag gca ctg cag gac tac gag ctg 1276
Gln Lys Leu Gln Asp Leu Leu His Glu Ala Leu Gln Asp Tyr Glu Leu
365 370 375
agc cag cgc cat gag gag ccc tgg agc agc gag aag ctg ctg ctg aca 1324
Ser Gln Arg His Glu Glu Pro Trp Arg Thr Gly Lys Leu Leu Leu Thr
380 385 390 395
ctg cag ctg ctg cgc cag agc gcc gcc aag gcc gta cag ccc ttc tat 1372
Leu Pro Leu Leu Arg Gln Thr Ala Ala Lys Ala Val Gln His Phe Tyr
400 405 410
agc gtc aac ctg cag gcc aac gtc ccc atg ccc aac ctc ttc ctg gag 1420
Ser Val Lys Leu Gln Gly Lys Val Pro Met His Lys Leu Phe Leu Glu
415 420 425
atg ctg gag gcc aag gtc tgaagcccc gcaacggcgc caatgccccc 1468
Met Leu Glu Ala Lys Val
430
ctanagacag acanacggac agatcgaggt ggaagactcc acanaccccc gctccaccc 1528
tcacccccct tatcatgctc ctgagctgc ccaagggcgg ggttttcca cctctggct 1588
gtctcagac tcccggtc acatcggtt ggaacggc tgggggca ggggtggg 1648

611
W000/11180
gtctcagctt aaatggcttt ttatttggta tgttttctct tctctatgga cggctggag 1708
gcttggcca gggctgactc ccttcaggag tgaagccac tggagcaat gctcttccc 1788
ctccacag ccaccagag gcaagctgtg cattctctaa ctcccttccc cctccccc 1828
tctgtgctt ggttggcgc tctcagctt gctatccac tggaggttt ccttcagag 1888
gggcagga cgaagggc acagatctt ttcttcaga ggtcttact gctctgaat 1948
cctctgggc caatcagag gcccaccc ttccacagc aggaatc 1998
<210> 3
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 3
tcacacacac agctgtgag cagc 24
<210> 4
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 4
ttctgagcg cctccagca ctgc 24
<210> 5

<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5
agctctatgc catgctctcc cct

23

<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 6
ggctctgctcg ttgtctgtc tgta

24

【図面の簡単な説明】

第1図 は、ヒト組織の1本鎖cDNAに対するRT-PCR産物のアゲロース電気泳動の結果を示す。レーンMは、λ/EcoT141のマーカであり、レーン1から10までは別に、それぞれ心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨髄、腎臓、脾臓、膵臓、胸腺のcDNAを鋳型にしたRT-PCR産物である。また、レーンCは、pERR4プラスミドDNAを鋳型にしたRT-PCRの結果である。

(図1)



第 1 図

【国際調査報告】

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO0/00106	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl ¹ C12N 15/12, A01K 67/027, A61K 31/7088, A61K 48/00, G01N 33/50			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl ¹ C12N 15/12, A01K 67/027, A61K 31/7088, A61K 48/00, G01N 33/50			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)			
SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X	Vincent Giguere et al., "Identification of a new class of steroid hormone receptors", Nature (1998), Vol. 31, No. 6151, p. 91-94	1-16, 18-41	
X	Katarina Pettersson et al., "Expression of a novel member of estrogen response element-binding nuclear receptor is restricted to the early stages of chorion formation during mouse embryogenesis", Mechanisms of Development (1996), Vol. 54, No. 2, p. 211-223	1-16, 18-41	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 11. 04. 00		国際調査報告の発送日 1 8.04.00	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 小暮 道明 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (1998年7月)

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP00/00106
C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	EP, 939123, A2 (SMITHKLINE BEECHAM CORP) 1.9月.1999 (01.09.99) & JP, 11-243971, A	1-16, 18-41
PX	WO, 99/10367, A1 (MERCK & CO INC) 4.3月.1999 (04.03.99) ファミリーなし	1-16, 18-41

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (1998年7月)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/00106

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT第17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 17 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲17に係る発明は、人の身体の診断方法に係るものである。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続表(1)) (1998年7月)

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	
A 6 1 P	13/12	A 6 1 P	13/12
	19/10		19/10
	29/00		29/00
	35/00		35/00
G 0 1 N	33/15	G 0 1 N	33/15
	33/50		33/50
			Z
			T
			P
			Z

(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), OA (BF, B J, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP (GH, GM, K E, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), UA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, C R, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, L C, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, S L, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(注) この公表は、国際事務局 (WIPO) により国際公開された公報を基に作成したものである。

なおこの公表に係る日本語特許出願 (日本語実用新案登録出願) の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項 (実用新案法第48条の13第2項) により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。